

Method and system for administering therapeutic and diagnostic agents

Patent Number: ☐ US4863713
Publication date: 1989-09-05
Inventor(s): MEARES CLAUDE (US); GOODWIN DAVID A (US); MCCALL MICHAEL (US)
Applicant(s): UNIV LELAND STANFORD JUNIOR (US)
Requested Patent: JP63005033
Application Number: US19860877327 19860623
Priority Number(s): US19860877327 19860623
IPC Classification: A61K49/00; A61K49/02; C07F13/00
EC Classification: A61K47/48T8M4, A61K51/10Z
Equivalents: DE3781946D, DE3781946T, ☐ EP0251494, A3, B1, JP2092707C, JP8005808B

Abstract

A method and system for localizing a diagnostic or therapeutic agent to an internal target site. The system includes (1) an epitopic compound, (2) a binding protein which is effective to bind specifically with the compound and capable of localizing selectively at the target tissue, when administered parenterally, and (3) a clearing agent which can bind to and cross-link the binding protein, to form a protein aggregate which is readily cleared from the subject's bloodstream. In practicing the method of the invention, the binding protein is administered to the subject parenterally, and allowed to localize at the target site, typically within 1-4 days. This is followed by a chase with the clearing agent to remove circulating, but not target-localized binding protein. When the epitopic compound is administered, binding of the compound to the localized binding protein, and rapid clearance of unbound compound by the kidneys, results in selective localization of the compound at the target site.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭63-5033

⑭ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑮ 公開 昭和63年(1988)1月11日

A 61 K 49/02
43/00

6742-4C
7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全19頁)

⑯ 発明の名称 化合物標的化方法およびそのシステム

⑰ 特 願 昭61-236984

⑱ 出 願 昭61(1986)10月3日

特許法第30条第1項適用 1986年4月3日～4月4日 メリーランドのベセスダで開催された「放射性物質で標識された試薬を用い細胞に特異的に作用することを利用する診断」に関する研究集会において発表

優先権主張 ⑲ 1986年6月23日 ⑳ 米国(US) ㉑ 877327

⑳ 発 明 者 デビッド エー. グツ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 アサートン,
ドウィン スノーデン アベニュー 97

㉒ 出 願 人 ザ ボード オブ ト アメリカ合衆国 カリフォルニア 94305 スタンフォード
ラスティズ オブ ザ (番地なし)
リーランド スタン
フォード ジュニア
ユニバーシテイ

㉓ 代 理 人 弁理士 山本 秀策
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

化合物標的化方法およびそのシステム

2. 特許請求の範囲

1. 腎臓によって迅速に除去される性質を有する診断もしくは医療用のエビトープ性化合物を被験体内部の標的部位へ局在化させる方法であって、該方法は、

(a) 該化合物に関連するエビトープに特異的にかつ高い親和性をもって効果的に結合し、そして(b) 被験体に非経口投与したときに標的組織へ選択的に局在化する能力を有する、結合タンパクを供給すること、

該結合タンパクを非経口的に投与し、そして該タンパクを標的部位に選択的に局在化させること、

非局在化循環結合タンパクを、循環結合タンパクと反応し巨大分子会合体を形成し得、該巨大分子会合体は該被験体の細網内皮系より迅速に除去されうる除去剤を非経口投与することによって、除去すること、そして、

該循環タンパクの大部分を除去するのに十分な期間の後、該エビトープ性化合物を非経口投与し、該化合物を局在化した結合タンパクに結合させ、非結合化合物を腎臓で迅速に除去することにより該化合物の標的部位への選択的局在化を達成すること、

を包含する、方法。

2. 前記結合タンパクがストレプトアビジン(streptavidin)であり、そして前記エビトープがビオチンである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記結合タンパクが抗体であり、そして前記エビトープが該抗体によって免疫特異的に認識されるハプテン部分である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 前記エビトープ性化合物が、前記結合タンパクに結合しうるエビトープ性部分を少なくとも2箇所含有する特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 標的部位に放射性核種を運ぶために用いられる特許請求の範囲第1項に記載の方法であって、

前記エビトープ性化合物が、安定な金属キレート錯体 (complex) を形成するために金属イオンと錯体化 (complexed) したエビトープキレート化合物である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 前記エビトープキレート化合物が、パラ置換エビトープもしくは化学修飾を有する1-フェニルもしくは1-ベンジルEDTAの金属キレートである特許請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 充実性腫瘍の処理に用いる特許請求の範囲第5項に記載の方法であって、前記キレート化合物が、 ^{90}Y 、 ^{197}Au または ^{64}Cu の金属キレートである特許請求の範囲第5項に記載の方法。

8. 体内の腫瘍の放射性映像を描くために用いる特許請求の範囲第5項に記載の方法であって、前記キレート化合物が、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{68}Ga 、 ^{65}Zn 、 ^{67}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{57}Co 、または ^{59}Co の金属キレートである特許請求の範囲第5項に記載の方法。

9. 体内の腫瘍を放射線感作するのに用いる特許請求の範囲第5項に記載の方法であって、前記キレート化合物は鉄、銅、またはルテニウムの金

属キレートである特許請求の範囲第5項に記載の方法。

10. 前記エビトープ性化合物を、充実性腫瘍部位に選択的に投与するために用いる特許請求の範囲第1項に記載の方法であって、前記結合タンパクの局在化の選択性が、腫瘍を供給する毛細管の壁を横切つての抗体の選択的透過に基づく特許請求の範囲第1項に記載の方法。

11. 放射性核種を前記腫瘍部位へ局在化させる特許請求の範囲第10項に記載の方法であって、前記エビトープ性化合物が、パラ置換スパーサーアームを含む1-フェニルまたは1-ベンジルEDTAの放射性核種金属キレートであり、前記結合タンパクが、該化合物に特異的な少なくとも2ヶ所の結合部位を含有し、そして、前記除去剤は、該結合タンパクと特異的に反応し得る結合部位を複数個含有する巨大分子である特許請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 標的特異部位を含む標的組織に対して、エビトープ性化合物を標的化するための特許請求の

範囲第1項に記載の方法であって、前記結合タンパクが該エビトープ性化合物に対して特異的な結合部位を少なくとも1箇所、そして、該標的特異部位に対する特異的な結合部位を少なくとも1箇所含有する特許請求の範囲第1項に記載の方法。

13. 標的特異部位を含む標的組織に対してエビトープ性化合物を標的化するための特許請求の範囲第1項に記載の方法であって、前記結合タンパクが、前記標的特異部位に対して特異的な少なくとも1個の抗体断片と共有結合しているストレプトアビジンである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

14. 被験体の内部の標的部位に診断または治療用試薬を投与するシステムであって、

試薬およびそれに関連するエビトープを含有するエビトープ性化合物、

(a) 該化合物に関連したエビトープに特異的にそして高い親和性をもって効果的に結合し、そして、
(b) 被験体に経口投与された際標的組織に選択的に局在化しうる、結合タンパク、および

該被験体の血液中を循環している前記結合タンパクと反応して、該被験体の細胞内皮系により迅速に除去される巨大分子集合体を形成し得る除去剤、

を含有するシステム。

15. 前記結合タンパクがストレプトアビジンであり、そして前記エビトープ性化合物がビオチンエビトープを含有する特許請求の範囲第14項に記載のシステム。

16. 前記結合タンパクが抗体であり、そして前記エビトープ性化合物が、該抗体によって免疫特異的に認識されるハプテン性エビトープを含有する特許請求の範囲第14項に記載のシステム。

17. 前記エビトープ性化合物が、前記結合タンパクと結合しうる少なくとも2個のエビトープを含有する特許請求の範囲第14項に記載のシステム。

18. 前記標的部位に放射性核種を運ぶために用いられる特許請求の範囲第14項に記載のシステムであって、前記エビトープ性化合物が、安定な金属キレート錯体を形成するために金属イオンと錯

体化したエビトブーキレート化合物である特許請求の範囲第14項に記載のシステム。

19. 前記エビトブーキレート化合物が、1-フェニルまたはベンジルEDTAの金属キレートである特許請求の範囲第18項に記載のシステム。

20. 前記エビトブーキレート化合物が、前記ベンジル部分にチオブタン Spacer アームにより結合した金属キレートである特許請求の範囲第19項に記載のシステム。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、薬品の標的特異的な局在化を生み出すために、治療あるいは診断化合物、特に放射性核種を投与するための方法およびシステムに関する。

(参考文献)

Chang, C.-H., et al, Biochem. Biophys. Res Commun **111**(3):959 (1983).

De Riemer, L.H., et al, J. Med. Chem. **22**: 1019 (1979).

Monoclonal Antibodies, Kennett, T.J., et al, eds Plenum (1980).

Umezawa, H., Pure Appl. Chem. **28**:665 (1970).

Wensel, T.C., et al, in Radioimaging and Radioimmunotherapy, Burchiel, S. W., et al, eds, Elsevier, p 185 (1983).

(従来の技術)

充実性腫瘍あるいは特定の臓器のような内臓の標的部位に対して、薬剤の標的化を向上させることが、最近の薬剤研究の主たる焦点である。薬剤の標的化の目的は、標的部位で薬剤を濃縮しかつ非標的部位でその効果を最小にすることにより、薬剤の効果を高めることにある。例えば、充実性腫瘍を処置するためのような治療上の目的のために薬剤を用いるところでは、薬剤の標的化によれば、ほとんど非腫瘍に関する副作用なしで、標的部位でのより効果的な投与をもたらす。同様に、放射性映像化に用いるために薬剤が放射性核種であるところでは、標的化は、標的領域とバックグラウンドとの間で高めにコントラストを与える。

De Riemer, L.H., et al, J. Lab. Comp. & Radpharm **18**(10):1517 (1981).

Priguet, B., et al, J. Immunol. Methods **77**: 305 (1985).

Fujii, A.J., Antibiot. **26**:398 (1973).

Goodwin, D.A., et al, Nuclear Medicine **14**: 365 (1975).

Goodwin, D.A., et al, Seminars in Nuc. Med. **VI**:3 (1976).

Goodwin, D.A., et al, In Radiopharmaceuticals II Proceedings of the Second International Conference on Rad. N.Y., Sodd, V.J., et al, eds, pp 275-284 (1979).

Goodwin, D.A., et al, J. Nuc. Med. **22**(9):787 (1981).

Goodwin, D.A., et al, Eur. J. Nuc. Med. **9**:209 (1984).

Kohler, B., et al, Nature **256**:495 (1975).

Meares, C. F., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **73**(11):3803 (1976).

というのは、放射性核種のバックグラウンドのレベルが減少したためである。

放射性核種は、提唱されている種々の標的戦略のための製薬剤の重要なグループである。静脈投与やキレート剤の系統的摂取により、内臓部位、特に充実性腫瘍を映像化するために用いる¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁴Cu, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ⁶⁵Zn, ⁶⁷Cu, ⁸⁷Ru, ⁵⁷Co あるいは⁵⁵Coの金属キレートのような放射性映像化化合物はこのグループに含まれる。イオン化放射由来の局在化した細胞破壊に基づき、⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re あるいは⁶⁷Cuの金属キレートのような、あるいは処置中の腫瘍に用いられる¹³¹Iおよびそれに類似したような放射性治療剤も、このグループに含まれる。製薬剤に関連のあるグループは、酸化還元機構を通じて細胞障害性効果を生む鉄キレート、銅キレート、あるいはルテニウムのキレートのような非放射性の金属のキレートであり、細胞で放射線の細胞障害作用を強化することもできる。

以前に、本発明者らは、放射性核種を標的化しかつ内臓部位、特に充実性腫瘍に対して金属を放

射性感受させるのに有用ないくつかの新規のキレート化合物について述べたことがある。一般的に、このような化合物は、第1の官能基として金属イオンと強固な錯体を形成し得るキレート部分、そして第2の官能基としてニトロ基およびアミン基のような化学的に反応性のある部分（この部分を介して、化合物は、標的化している分子あるいは他の分子に連結し得る）を有する二官能性のキレート剤である (Heares, 1976; Goodwin et al, 1975, 1976, 1979)。

本発明者らが発展させたキレート化合物のうちのある新規なクラスは、ブレオマイシンの種々のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) キレートであり、これらは多くの型の腫瘍内に局在する抗腫瘍性抗生物質である (Umezawa, Fujii)。このブレオマイシン/EDTA化合物は、充実性腫瘍内で、 ^{57}Co や ^{111}In を含む種々の放射性核種の選択的な腫瘍の局在性を与えることが示されている。これらの化合物の中で最も初期の化合物のうちの1つは、キレートをスルニウム基を介してブレオマイシンに

結合させるために、p-プロモアセトアミドベンジル-EDTA (BABB-EDTA) のような反応性のある二官能性の化合物を用いて、精製ブレオマイシン A_2 をアルキル化することにより、調製した。単座配位のコバルト-硫酸の配位結合を介して、二官能性のEDTA分子をブレオマイシン-Co錯体に連結させることにより形成したより最近の化合物を、共有している米国特許出願「ブレオマイシン結合物および方法」№712,377, (1985年3月15日出願) に述べている。

充実性腫瘍のような標的部位に対して、上記のブレオマイシン/金属キレート化合物のような標的化している小さな放射性核種化合物で観察されている制約条件の1つは、標的部位での化合物の濃度が比較的低いことである。標的部位における低い薬剤投与量は、腎臓による化合物の迅速な除去による。この除去によれば、標的部位での局在化に有効な血流中での化合物量が制限される。投与される化合物の投与量を単に増やすことは実際の解決法ではない。ほとんどの放射性核種は有

害であり、それゆえ投与量限界があるからである。

投与量限界はあるが、迅速に除去される標的化合物の濃度を増加させる1つの方法は、抗体と錯体化した形でこの化合物を共に投与することである。その比較的大きなサイズのために、この錯体は腎臓では除去されないが、その代わりに網内系 (RES) で数日間かけて血流からゆっくりと除去される。この方法は本発明者らにより、二官能性のインジウム/キレート化合物 L-ベンジル-EDTA- ^{111}In (LBEDTA-In) に対して調製された2種のモノクローナル抗体 (Mabs) を用いて、以前に研究されている。結合の研究によれば、両抗体はこのインジウムキレートに特異的で、他の金属のキレートに対するKb値の少なくとも約20倍の、インジウムキレートに対するKb値を有することが示された。BLEDTA- ^{111}In を共に投与すると、この抗体は、24時間後に10-30倍の間でBLEDTA- ^{111}In の全身のレベルを増加させた。これは、おそらく血流からゆっくりと除去される強固に結合した全身型でBLEDTA-In化合物を保持することによる。

しかし、抗化合物抗体を循環させて化合物の摂取を増加させることは、比較的非特異的な効果である。というのは ^{111}In レベルに対して試験された種々の臓器も、24時間後に顕著に増加した放射活性を示した。それゆえ、抗体を共に投与することにより、腫瘍が化合物を高レベルで摂取することで生じる利点は、(1)非腫瘍臓器での放射活性（あるいは治療剤）の高いバックグラウンドレベルがより高くなること、および(2)結合物に対して、患者の全身におけるより長い接触時間、例えばキレート化された放射性核種を有する結合物の場合ではより長い接触時間、により部分的に相殺される。

本発明者らにより行われた研究は、無害、あるいは非放射活性の競合抗体で患者の血流を流すことにより、このような好ましくない副作用を低減し得ることを示している。例えば、本研究は、全身の ^{111}In レベルが、(抗原に依存して)急激に流し入れるような投与後3時間で、約20-80%より減っていることを示している。しかし、抗体で

高めることによる方法では、丁度、顕著な標的物の分布の効果を爲るために、少なくとも数時間という期間を要することが記述されている。それゆえ、この方法は、約1時間から数時間の間の半減期を有する ^{99m}Tc や ^{67}Ga のような放射性核種には適していない。

(発明の目的)

本発明の1つの一般的な目的は、治療用あるいは放射性診断用の化合物を標的組織に標的化するために、上記で論じた問題や当業者に公知の制約条件を実質的に克服するべく改良された方法およびシステムを提供することにある。

本発明のより特定の目的は、充実性腫瘍の領域に放射性核種を選択的に標的化するための方法およびシステムを提供することにある。

本発明の他の目的は、高レベルの放射性核種あるいは他の薬剤化合物への身体の接触がほんの短時間で行われるような方法およびシステムを提供することにある。

さらに、この方法の他の目的は、 ^{67}Ga のような

非常に短命の放射性核種に適合するシステムや方法を提供することにある。

(発明の要旨)

本発明の化合物標的化方法は、腎臓によって迅速に除去される性質を有する診断もしくは医療用のエピトープ性化合物を被験体内部の標的部位へ局在化させる方法であって、該方法は、(a)該化合物に関連するエピトープに特異的にかつ高い親和性をもって効果的に結合し、そして(b)被験体に非経口投与したときに標的組織へ選択的に局在化する能力を有する、結合タンパクを供給すること；該結合タンパクを非経口的に投与し、そして該タンパクを標的部位に選択的に局在化させること；非局在化循環結合タンパクを、循環結合タンパクと反応し巨大分子会合体を形成し得、該巨大分子会合体は該被験体の細網内皮系より迅速に除去されうる除去剤を非経口投与することによって、除去すること；そして、該循環タンパクの大部分を除去するのに十分な期間の後、該エピトープ性化合物を非経口投与し、該化合物を局在化した結合

タンパクに結合させ、非結合化合物を腎臓で迅速に除去することにより該化合物の標的部位への選択的局在化を達成すること；を包含する。

本発明の化合物標的化システムは、被験体の内部の標的部位に診断または治療用試薬を投与するシステムであって、試薬およびそれに関連するエピトープを含有するエピトープ性化合物；(a)該化合物に関連したエピトープに特異的にそして高い親和性をもって効果的に結合し、そして、(b)被験体に非経口投与された際標的組織に選択的に局在化しうる、結合タンパク；および該被験体の血液中を循環している前記結合タンパクと反応して、該被験体の細網内皮系により迅速に除去される巨大分子会合体を形成し得る除去剤；を含有する。

本発明は、ある局面では、被験体の内臓の標的部位に、腎臓で迅速に除去されるサイズの診断用あるいは治療用のエピトープ性化合物を局在化させる方法を包含する。方法を実践するに際し、(a)特異的に結合するのに効果的で、化合物に関連したエピトープに高い親和性を有し、そして(b)被験

体に経口で投与すると、標的部位で選択的に局在化し得る結合タンパクが供給される。この結合タンパクは、代表的には化合物に関連している抗原性エピトープに特異的な抗体、または小さなエピトープ部分（例えば、ビオチン）に高い結合親和性のある非免疫グロブリン結合タンパク（例えば、ストレプトアビジン）である。

この結合タンパクは、関連したエピトープ性化合物なしで患者に経口投与され、標的部位に選択的に局在化される。局在化のための代表的には1日から4日後に、局在化せずに循環している結合タンパクは、この循環している結合タンパクと反応して巨大分子会合体（これは被験体の細網内系から迅速に除去され得る）を形成し得る除去剤を経口投与することにより、除去される。この除去剤は、代表的には、担体巨大分子を含む。この担体巨大分子は、例えば、人の血清タンパクであり、これは多くの共有結合性エピトープ基を含有している。この会合体のほとんどを除去するのに十分な期間、代表的には約1日かそれ以内の後、この

エビトープ性化合物が経口投与され、それによりこの局在化した結合タンパクに化合物が結合される。そして未結合の化合物の腎臓による迅速な除去により、標的部位での化合物の選択的な局在化がなされる。

ある実施態様では、このエビトープ性化合物は金属イオンと錯体化して安定な金属キレート錯体 (metal chelate complex) を形成するエビトープキレート化合物である。この結合タンパクは化合物のエビトープ部分に特異的な抗体である。代表的なキレート化合物は、パラ位の置換したスベサームを有する 1-フェニルあるいは 1-ベンジル EDTA の金属キレートである。この金属は、 ^{111}In , ^{67}Ga , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{65}Zn , ^{67}Cu , ^{90}Ru , ^{57}Co あるいは ^{55}Co のような放射性映像に有用な放射性核種であり得る。腫瘍の治療には、 ^{90}Y , ^{197}Au あるいは ^{64}Cu のような放射性核種が用いられる。あるいは、キレート化した鉄、キレート化した銅、またはキレート化したルテニウムのような放射線感受性のキレート化した金属が用いられる。

試薬は、製薬的に活性のある治療部分あるいは放射性映像化される部分 (活性部分)、および 1 つまたはそれ以上のエビトープ性の部分またはエビトープ性の認識部分を有するエビトープ性化合物である。この認識部分は、エビトープ特異的な結合剤に特異的かつ高い親和性で結合し得る。

この化合物の活性部分は、薬剤、放射性核種、ホルモン、毒素、代謝物、抗代謝物、ビタミン、酵素-補因子のような製薬的に活性のある試薬またはその類似物である。この類似物は、天然のエビトープ部分を含むかあるいは、より通常の場合では、活性を失うことなしに必要なエビトープ部分を含むべく修飾されまたは誘導され得るいずれかである。このような活性のある試薬には、ドキソルビシン、シスプラチン、DNAアルキル化剤または架橋剤で例示されるような抗腫瘍剤、および抗代謝物；アミノグリコシドやポリエンのような抗菌剤；およびアンホテリシン B のようなマクロライド系抗生物質が含まれる。本発明で有用な治療用薬剤および診断用薬剤の一つの主なクラ

本発明のシステムは、局在化され、関連したエビトープ部分となり得る試薬を含むエビトープ性化合物や、(a) 特異的に結合するのに効果的で、化合物に関連したエビトープに高い親和性を有し、そして (b) 被験体に経口から投与すると標的部位で選択的に局在化し得る、結合タンパクを含有している。この系では、また、被験体の血流中で循環させて、この結合タンパクと反応し、巨大分子集合体 (これは被験体の細網内系から迅速に除去され得る) を形成し得る除去剤も含む。

本発明のこれらの目的および他の目的および特徴は、以下の本発明の詳細な説明を添付の図面と合わせて読むと、より完全に明らかになるであろう。

1. 系の化合物の調製

A. エビトープ性化合物

本発明は、充実性腫瘍あるいは選択された臓器あるいは組織部位のような特定の臓器部位で、治療用の試薬または放射性映像用の試薬を標的化する際に用いるべく意図されている。標的化される

スは、放射性映像化に有用なキレート化した放射性核種、腫瘍治療に有用なキレート化した放射性核種、および放射性感受性のキレート化した金属である。放射性映像化に有用なキレート化した放射性核種には、例えば、 ^{111}In , ^{67}Ga , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{65}Zn , ^{67}Cu , ^{90}Ru , ^{57}Co または ^{55}Co がある。腫瘍治療に有用なキレート化した放射性核種には、例えば、 ^{90}Y , ^{197}Au または ^{64}Cu がある。放射性感受性のキレート化した金属には、例えば、キレート化した鉄、キレート化した銅あるいはキレート化したルテニウムが挙げられる。

ここではエビトープとも言及しているエビトープ部分は、抗エビトープ結合タンパクにより特異的に、高い結合親和性で認識される化合物の構造部分である。抗体結合タンパクにより特異的に結合されるハプテン性抗原すなわち、ストレプトアビジンで特異的に結合されるビオチン、アビジンあるいはその類似物質 (これ以降 "ストレプトアビジン" として言及する)、および植物のレクチン結合タンパクにより結合されるタイプの炭水化

物は、ここではエビトープの好ましいクラスである。

本発明の方法は、エビトープ性化合物を極口投与したときに腎臓から迅速に除去され得るのに充分小さくかつ可溶であることが必要である。代表的には、約50,000ダルトン以下、好ましくは約10,000ダルトン以下の分子量を有し、血清中において、親水性の形状かつ単一の分子形状として主に存在する分子は、これらの必要条件を満足する。

通常の場合では、このエビトープ性化合物は、ビオチンのような1つまたはそれ以上の異なるエビトープ基あるいは所定の抗原を用いて活性のある薬剤を誘導することによるか、またはモノクローナル抗体が生じ得る抗原性部分あるいはハプテン性部分を生成するような活性のある薬剤を修飾するかのいずれかにより調製される。修飾および誘導の両反応は、一般的に、カルボキシル部位、アミノ部位、ニトロ部位、ヒドロキシル部位、アルデヒド部位およびスルフヒドリル部位のような反応性のある化学部位で化合物を誘導あるいは修

飾したりするための公知方法に従う。これらの反応は、直接的なアルキル化反応、カルボジイミド、イソチオシアン酸エステルあるいはN-ヒドロキシスクシンイミドのような活性化剤を通じて進行するカップリング反応、またはグルタルアルデヒドのような二官能性の架橋剤を通じてのカップリングを包含し得る。適当な反応は当業者に公知であり、これは活性化剤中で用いられる反応基の性質、この活性化剤の活性部位の必要条件に関する情報、および所望の化学修飾あるいはエビトープ付加のタイプに基づいている。以下で述べる化学的な誘導反応または修飾反応は例証となる。

本発明で有用な活性化剤のある重要なクラスは、二官能性のキレート剤である。本発明者らが先に報告したこれらの化合物は、種々の製薬上有用な金属と強固な金属錯体を形成し得るEDTAあるいは他の金属キレート化機能体を含む。このキレート部分は、代表的には、ニトロ基、アミン基またはプロモアセトアミド基のような官能性の反応基とベンゼン環を介して結合している。この官能性の

反応基は、タンパク、プレオマイシン、または誘導した化合物や修飾した化合物中でハプテン部分を形成し得るより小さい分子のような、他の分子に化合物をカップリングさせるのに使用可能である。化合物A および Bを生成するのに用いられる修飾反応は例証となる。

第1図の化合物Aは、安定な単座配位のCo(III)-S結合を介して二官能性のEDTAへと誘導されたコバルト/プレオマイシン(BI-Co(III))化合物である。この化合物の合成は、ここで挙げた参考文献にあり、"プレオマイシン結合物および方法"の上記引用特許出願に詳しく述べられている。簡単に、BI-Co(III)-H₂Oが、以下の条件で1,4-ジチオールブタンとの反応に供される。この条件とは、コバルトと結合した水の不可逆的な置換がなされ、そしてBI-Co(III)-S-(CH₂)₄-SHが形成される条件である。この合成は、ジチオ-プレオマイシン化合物とp-プロモアセトアミドベンジル-EDTA(BABE-EDTA)とを反応させ、誘導したプレオマイシン化合物を高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)

で精製することにより完結する。このチオブタンのスペーサーアームは、長さや組成が異なり、種々の遊離末端の化学基(例えばチオール基、アミン基、カルボキシル基またはヒドロキシル基)で終わる種々の炭素含有鎖で置換され得ることは、ここでは注目に値する。この置換により、この炭素含有鎖は、二官能性のキレートに共有結合的に連結され得る。同様に、この二官能性のキレートは、スペーサーアームの遊離末端に共有結合的に連結するのに適当な種々の化学基のうちの1つを有し得る。

第1図のBで示される化合物は、化合物Aと同じジチオブタン-BABE-EDTA構造を含む。しかし、Coに結合したプレオマイシンはない。この化合物は、実施例1に記述されているように、1,4-ジチオブタンをBABE-EDTAと直接反応させることにより形成され得る。以下の節1Bで見られるように、チオブタン-BABE-EDTA-Co抗原に対して調製されたモノクローナル抗体(Mabs)は、化合物AとBの両方の金属キレートと特異的な反応性がある。そ

れゆえ、各化合物は、実験的に活性のある試薬 (BABB-EDTA-金属キレート) の代表例である。この試薬は、免疫化した動物中にて抗体の応答を引き起こし得るハプテンを形成するべく、(4つの炭素-硫黄で結合されたスペーサーを加えることにより) 修飾される。この2つの修飾反応は、また、一般に薬剤やキレートカップリング反応を例示している。この反応では、化合物の官能性部分で修飾や付加の効果を最小にするべく、スペーサーアームが用いられる。

エпитーブ性の化合物を調製するのに用いられる誘導反応を説明するために、上記の二官能性のキレートが、ストレプトアビジンに対して特異的かつ高い親和性をもって結合し得るエピトープ性のビオチンキレートを生成するように、ビオチン部分に結合され得る。1つの結合方法では、遊離末端のアミンを有する二官能性のキレートが、ビオチンのN-ヒドロキシスクシンアミド (NHS) エステルとの反応に供され、アミド結合を介してキレートのアミンにビオチンが連結される。例えば、

濃縮されたアンモニア水中でのアミノ化により、BABB-EDTA からキレートアミンが形成され得る。このNHS ビオチンエステルは市販されている。得られたビオチン化したグリシンアミドベンジルBDTA (GABB-EDTA) は、ストレプトアビジンに対する高い親和性をもって結合することが示されている。他の活性のある試薬は、同様の方法により、炭水化物またはハプテン性分子を用いてビオチン化され、あるいは誘導され得る。

高められた抗体結合を与えるため、2つまたはそれ以上のハプテンエピトープを含むエピトープ性化合物が、上記で論じた方法と同じ一般的な方法により調製され得る。多量のエピトープを用いて活性のある試薬を誘導する際に、この個々のエピトープは、活性のある試薬上の異なる部位に付着させ得る。あるいは、これは、活性のある薬剤に付いた単一のスペーサーアーム上の異なる位置に付着されてもよい。活性のある試薬がハプテン形に化学的に修飾すると、二量体形で化合物がともに結合することにより、2価の種を形成するこ

とが可能である。例えば、第1図の化合物Bは、2価のハプテン種を形成するために、ジスルフィド結合を介して容易に二量体化され得る。

B. 結合タンパク

本発明の系の結合タンパクは、内臓の標的部位に特異的に局在化させ得る標的化試薬として、および標的部位に対しエピトープ性化合物を結合させるための結合試薬としての両方の役割を果たす。

このタンパクの第1の結合特性を考慮すれば、この結合タンパクおよびエピトープ性化合物のエピトープは、特異的かつ高い親和性をもって結合している対の反対の部分であることが上記で注目される。この結合対は、抗原-抗体、ビオチン-ストレプトアビジン、および炭水化物-レクチンの対を包含し得る。これらの結合対の各々において、このエピトープは、化学基の3次元配置を呈する比較的小さな物質である。また、結合タンパクは、親和性の高い結合で2つの種を結合させるべく、このエピトープと強力な非共有結合性の相互作用をもたらす表面特性を有する、比較的大き

な種である。さらに、一般的には、この結合タンパクは、2個かそれ以上の結合部位、およびエピトープ性化合物、2個またはそれ以上のエピトープを含んでいてもよい。より好ましい結合定数は少なくとも約 $10^8 M^{-1}$ であり、さらに好ましい結合定数は約 $10^{10} M^{-1}$ と $10^{12} M^{-1}$ の間である。結合親和力がより高くなれば、それに応じて本発明を実施するのに使用される結合タンパクがより少なくなる。特に、結合タンパクがHAbであると、このことは著しく有利となり得る。例えば、 10^8 の結合定数を有するミリグラム量の抗体が、効果的な化合物の標的化に必要なならば、ミリグラム量やナノグラム量が、それぞれ 10^{12} と 10^{13} の結合親和性を有する結合タンパクを用いて同程度の化合物の局在化を果たすのに必要であろう。

モノクローナル抗体 (HAb) の結合タンパクは、通常のハイブリドーマ技術により、多量のハプテン性エピトープに対して調製され得る。それゆえ、この結合タンパクは、化学的に修飾または誘導したほとんどのエピトープ性化合物に対して、一般

的に適している。選択されたエпитーブに対する Mabs を形成するため、このエピトープ性化合物、あるいはこのエピトープを含む同類の化合物は、動物、望ましくはマウス（そのリンパ球はミエローマ融合技術により永久増殖化し得る）に注入する標準的な免疫学的技術により調製される。代表的には、それ自体が腎臓により迅速に除去される化合物が、腎臓による迅速な除去を防ぐために、大きなタンパクかその類似物に共有結合的に結合される。そして、この化合物は、動物の免疫学的な応答を高めるべく、フロインドアジュバントのようなアジュバントと混合される。このアジュバント混合液は、この物質がゆっくりと血流に放出されるように、通常の場合では、筋肉内あるいは皮下注射により投与される。2～4週間後、脾細胞が動物より引出される。この脾細胞は、培地で長期間成長し得る抗体産生細胞を精製するために、マウスのミエローマ細胞のような永久増殖した細胞と融合される。この融合細胞は、所望のエピトープに対して特異的な抗体を分泌する細胞に対し

て選択性を有する。抗体産生ハイブリドーマ細胞の生成法および選択法は公知である（コーラー）。実施例2は、担体タンパクとして、キーホールリムベットのヘモシアニンに付けた上記のチオブタン-BABE-EDTA-Co ハプテンに対して特異的な Mabs を生産するように用いられる手順を詳しく述べている。WC3A11, WC4B7, および WC3P5と変えている3つの抗体産生細胞系を選抜し、3種のすべての系からの抗体は、ジチオブタン-BABE-EDTA-Co（第1図の化合物BのCoキレート）やIn-BLEDTA-IV（第1図の化合物AのInキレート）の両方に対して特異的であった。

実施例2で与えられた結合のデータは、上記に述べた3種の抗チオブタン-BABE-EDTA Mabs が、約 $1-6 \times 10^{-11} M$ の間で選抜されたエピトープ性の金属キレートに対して結合親和性を有する。より高い結合親和力は、2つの一般的な戦略のうちの1つにより得られる。その第1の方法は、抗原特異的な抗体が興味あるエピトープにより強固に結合するハイブリドーマ細胞系を選抜することにある。

第2の方法は、抗体と2価あるいは多価の抗原との間で観察される一般的により高い結合親和性に基いている。この効果は、注目すべきであるが、小さなエピトープ性化合物に対しては立体的に不可能な2つの抗体結合部位と2つのエピトープとの同時結合によるものではない。しかし、1つ以上のエピトープが存在する抗体に、エピトープ結合の統計的に高まる機会に関係していると思われる。

2価あるいは多価のエピトープ性化合物で認められる結合の高まりの範囲は、また本発明の方法で標的部位に局在化する抗体濃度に依存する。もし多価の抗体が表面支持体に確保された2つの抗体に同時に結合し得るならば、高まった抗原/抗体結合が生じることはよく知られている。それゆえ、そのような架橋した抗体の結合をさせる標的部位での抗体の濃度を仮定すると、2価あるいは多価のエピトープ性化合物の供給は単価の化合物で見られるものより10倍かそれ以上で標的での結合を高めることができるだろう。多価のエピト-

ープ性化合物の調製法は上記で論じている。

抗体が広範囲の種類のエピトープに対して調製されうるという有利性を示すのに対して、ストレプトアビジンは、このエピトープビオチンに対して非常に高い結合定数（約 $10^{13} M^{-1}$ ）を有するという有利な点がある。上記のごとく、このことは、本発明が、注入された結合タンパクの極めて少量の使用を実現し得ることを意味している。ストレプトアビジンは細菌性タンパクであり、これは人の治療に適するように精製した形で市販されている。ビオチンを用いたキレートや他の活性薬剤の誘導方法は上記に論じている。

この結合タンパクの標的機能を考慮すれば、本発明は、経口投与の際、血流から選択的に標的部位を局在化するためのタンパクの性能に依存している。効果的な局在化のためには、このタンパクは、(a) 血流中にて相対的に長い半減期を有すること、および(b) 標的部位で選択的に蓄積されうること、が必要である。大きさの必要条件に関して、この抗体は迅速な腎臓での除去を防ぐには充分大

きい。しかし、RESによる迅速な除去を促進するほどは大きくないことが必要である。約50から500,000ダルトンの間の大きさの範囲で、以下で論じる種々のタイプのハイブリッドタンパクを含む結合タンパクが最も適している。

この結合タンパクの標的能力は、標的部位の抗原に特異的に結合するタンパクの能力、あるいはタンパクサイズまたは膜透過特性、あるいはこれらの因子の組合せに基づいていてもよい。腫瘍標的部位を含むほとんどの標的部位は、結合タンパクが誘導され得る組織特異的な表面抗原を含む。また種々の正常な、そして悪性な組織に対して特異的な抗体が報告されている。

この結合タンパクの組織特異的な結合特性は、このエピトープ性化合物に結合するのに必要な結合特性を付加的に備えていることが認識されるだろう。それゆえ、組織抗原およびエピトープ性化合物の両者に対する1つまたはそれ以上の結合部位を含む結合タンパクを構成することが一般的に必要な。2つの異なる抗原に対して特異性の

あるハイブリッドの2価の抗体が今までに報告されている。米国特許No. 4,474,893号の読本に開示されている1つの調製方法では、1つの抗原に対して特異的な抗体を分泌するハイブリドーマは、B-リンパ球、あるいはハイブリドーマ（これは、第2の抗原に対する抗体を分泌し得る）に融合される。三融合体あるいは四融合体の融合産物のいくつかは、両抗原に対して特異的なハイブリッド抗体を分泌することが見出されている。別の方法では、完全な抗体の酵素分解により生じたF(ab')₂断片あるいはFab断片が、異なる抗原に対して誘導される結合部分を有する抗体分子を産むために、1つの別の、あるいは完全な抗体に化学的に連結される。代表的には、この方法では、標的部位の抗原に対して特異的な完全な抗体が、エピトープ性化合物に対して特異的なFabの酵素分解により形成されたFabあるいはF(ab')₂断片で誘導される。この連結は、このタンパクにスルフヒドリル基を付加するために、例えばトラウト試薬（実施例2および3を参照）で正味のタンパクを第

1に誘導することにより、実行され得る。エピトープ特異的なタンパク由来のこの抗体断片は、通常の二官能性試薬によりスルフヒドリル基に連結される。この二官能性試薬は、抗体断片のアミンと連結するためのNHS末端基や誘導した完全な抗体中のスルフヒドリル基に連結するための反対側の末端のマレイミド基を有している。他の連結方法は、当業者に公知である。

必要に応じて、抗体あるいは抗体結合断片は、類似の連結法によりストレプトアビジン（またはレクチン）に化学的に連結され得る。ここでは、このハイブリッドタンパク中の抗体断片は、組織標的化のために機能する。これに対して、アビジン部分は、その部位に標的化されるビオチンで標識された化合物に対する高い親和性のある結合を提供するだろう。

腫瘍の標的化に適したある実施態様では、この腫瘍での選択的な局在化は抗原特異性に基づくものではなく、より透過可能な、すなわち漏れやすい毛管を選択的に浸透させるタンパクの能力に基

づいている。この毛管は、通常、充実性腫瘍に関連している。この方法の利点は、この結合タンパクを調製するのがより簡単などところにある。以下の実施例5や6は、この方法により達成し得る非特異的な腫瘍の局在化の程度を説明している。

C. 除去剤

本発明の系での除去剤は、RESによる結合タンパク会合体の迅速な除去を促進するため、結合タンパクと結合しかつこれと架橋するように機能する。この結合タンパクは、処置された個人の血流中で循環している。この試薬は、腎臓における迅速な除去を避けるのに、好ましくは十分な大きさである。この試薬は、循環している結合タンパクを架橋しかつ金合するために、充分な多価性を含んでいる。それゆえ、このタンパクは約50,000ダルトンかそれ以上の分子量を有するのが好ましく、約1:4のタンパク:エピトープモル比かそれ以上のモル比のエピトープで誘導される。除去剤によるタンパクの金合には、また各結合タンパクで少なくとも2つのエピトープ結合部位を要するこ

とがここでは注目されている。

人の使用に対し1つの好ましい除去剤は、この結合タンパクにより特異的に認識される多くのエпитーブで誘導される人のタンパクである。以下の実施例3では、Mabsを除去しかつ架橋するためのチオブタン-BABE-EDTA-Coで誘導した人のトランフェリンからなる除去剤の調製が述べられている。このMabsは、第1図中のAやBで示されているタイプの化合物に対して特異的である。

II. 治療および放射性診断の方法

A. 結合タンパクの局在化

本発明の方法は、腫瘍領域、内臓器、あるいは他の特異的な組織領域のような選抜された体内の部位への、治療用あるいは放射性診断用の試薬標的化を行うように意図されている。

この方法の第一段階として、結合タンパクを非経口投与で（すなわち血流中に）、好ましくは、静脈内（IV）投与により、投与される。しかし、皮下、腹腔内、およびリンパ腺内のような他の経路も、本出願の内容に包含される。ここから、こ

のタンパクはゆっくりと血液から、組織液（ECF）を経て、標的部位を含む体組織へと通っていく。このタンパクは、タンパクの標的的特徴のために、腫瘍部位にて好んで蓄積される。この最初の段階は、第2図の上段に描いてあり、これはECFを通じて血流（点線の間）から腫瘍部位への抗体結合タンパクのゆっくりした通過を示している。

本発明の重要な利点によれば、この結合タンパクは錯体化されない形すなわち結合したエピトープ性化合物なしで供給され、その結果、処置された個人は最初エピトープ性化合物に接触しない。注入された結合タンパクの量は、最後の標的段階では、標的部位でのエピトープ性化合物の選択された濃度となるように計算されている。この量は種々の要因に依存している。この要因には、(a) 体の標的領域および非標的領域における結合タンパクの局在化の相対的な程度、(b) 血液中の結合タンパクの永続性、および最も重要には、(c) 標的部位に局在するときの、エピトープ性化合物に対する結合タンパクの結合定数がある。

投与される結合タンパクの最適な量は、動物モデル系での実験的研究と公知の結合定数とを組合わせることにより、およそ決定され得る。一般的な規則として、標的化された化合物の一定の濃度を得るために投与しなければならない結合タンパクの量は、このタンパク/化合物の結合定数に逆の相関を示す。例えば、予備的な動物研究が、 $10^9 M^{-1}$ の結合定数の抗体に対して約1 μg の抗体投与を示すならば、結合定数が $10^{12} M^{-1}$ の抗体1 μg の抗体投与により同じ濃度が達成されるだろう。上記のごとく、結合定数は標的部位での結合しているタンパクの濃度それ自体に依存するという考えにより、多価のエピトープ性化合物の場合には、この規則は調節される。

このタイプの研究は、エピトープ性キレートに結合している放射性核種の効果的な標的化では、1価のエピトープ性化合物に関して約 $10^9 M^{-1}$ の結合定数を有する抗体に対して、約10-100ngの最初の抗体が人の投与には必要であることを示している。ビオチン化した金属キレートに対して、約

10^{12} の結合定数と仮定すると、比較可能な放射性核種のレベルは、約10ng-100ngの間の全投与において、ストレプトアビジン結合タンパクを用いて達成され得る。

血液中で1日から数日の循環半減期を有する投与した結合タンパクは、代表的には1-4日の期間以上も標的臓器に局在することがある。この期間では、この結合タンパクは、標的部位だけでなく他の組織も同様に、血流からゆっくりと汲み取られる。腫瘍の場合では、標的部位での結合タンパクの蓄積は、腫瘍に供給する毛管の比較的大きな漏出性のために、高められる。以前に述べたように、腫瘍の局在化は、腫瘍の優先的な抗体の漏出に単に基づいているにすぎない。この機能は実施例5で説明される。この実施例5は、表2Aで血液、腫瘍、そして種々の臓器に対する抗体の取込み値を示している。ここで、投与後24時間で、抗体の集積した主な部位は血液および腫瘍であるが、肺や肝臓のようないくつかの内臓も抗体の集積を示したことが認められている。

B. 結合剤の除去

本方法第2段階において、標的に蓄積した結合タンパクのレベルに多少とも影響を与えることなく、タンパクの全血中レベルを数倍減じるべく、循環している抗体が血流から迅速に除去される。第2図の中央枠に描かれているこの段階は、血流中での結合タンパクと除去剤との会合体の形成、およびRESによるこれら会合体の迅速な除去に基づいている。この図では、血流中に形成された会合体は、肝臓、RESによる取込みの中心部位、により除去されることが示されている。その迅速な除去のために、この除去剤は血流の外側に多少とも蓄積せず、それゆえに血流の外側にすでに局在化している結合タンパクの配置には、ほとんど影響を与えていない。

投与される除去剤の量は、除去段階時に処置された個人の血流にあるように計算した抗体の分量に関して、好ましくは約1:5-5:1の間のモル比である。実施例5のデータからわかるように、24時間後の血流中に保持されている抗体量は、代

表的には投与した全量の約15-25%の間にある。

この結合タンパクの除去のための全時間、すなわちエビトープ性化合物の投与前の時間は、15分ほどの短さでもよい。しかし、代表的には約0.5-1時間の範囲である。実施例5のデータからわかるように、除去段階前と後とで、血液により取込まれた(24時間放射能でラベルされた)エビトープ性キレートで測定すると、1時間の除去段階で抗体の血中レベルが減り、抗体注入後24時間で約25倍減少し、同時におそらく血流中で遊離の型で得られるより多くのキレートのために、より多くのキレートが、除去された動物の標的腫瘍組織内にて濃縮していた。血流からのタンパク除去の範囲は、血流からの循環している映像用タンパクの迅速な除去に対して特異的な抗体を用いる点で、以前に本発明者により観察されているものと同様である(Goodwin, 1984)。

C. エビトープ性化合物の取込み

最終の標的化の段階において、エビトープ性化合物の局在化結合タンパクによる選択的取込みの

ために、エビトープ性化合物は非経口的に、より好ましくは静脈中に投与される。第2図の下部に説明されているに、この段階には、腎臓による血流からの迅速な除去に拮抗する、局在化した抗体によるこの化合物の迅速な取込みが包含される。

投与したエビトープ性化合物の量は、化合物の注射後短期間に、通常は注射後1~4時間以内に、標的部位に化合物が所望の濃度となるように計算される。結合タンパクと同様、この化合物に対する結合タンパクの既知の結合アフィニティーと組合わせた動物モデル系の研究から、最適投与量をおおよそ計算することができる。

エビトープ性キレート放射性核種化合物の腫瘍局在性に関するいくつかの研究が行われており本発明を根拠づけている。そのような研究の一つでは、実施例5に詳述してあるが、第1図AのBLEDTA-IV-¹¹¹In化合物を抗体注射後25時間、そしてヒトトランスフェリン ベンジル-BDTA-In 除去試薬による抗体除去段階後1時間で投与した。化合物投与後3時間における、放射性標識の血液、

腫瘍、そして種々の他の組織への分布、およびそれに対応する腫瘍/器官の放射性活性比率を、実施例5の表2Cに示す。そこに見られるように、腫瘍中の放射性標識の量は、血液中のそのほぼ10倍、そして腎臓と肝臓とを含む主要内臓器官中のその数倍であった。それと比較して、抗体除去段階を除いて、抗体注射23時間後の1時間での化合物の取込みを実施例5の表2Bに示す。ここに見られるように、血液、肺および腎臓、そして他の内臓器官における腫瘍対器官の比率は、通常、1未満である。

実施例6で詳述するもう一つの研究では、上記WC3A11抗体を投与し、それに続き20時間後にトランスフェリン標識TBEDTA-Coによる追出しを行った。1時間後、¹¹¹In-BLEDTA-IVを加え、3時間にわたり局在化と腎臓での除去をさせた。処理を行った動物の全身放射性映像化は、第3図Aに見られるように、腎臓(K)、膀胱(B)および腸の腫瘍(T)中の標識の局在を示す結果を与えた。標識注射後3時間の腫瘍、血液、そして他の組織中の標

臓の分布を実施例5の表3に示す。そのデータは、血液および他の内臓器官における高い腫瘍対器官の比率を示す表2C中のデータと一致する。この研究に見られるような、腎臓中のより高い放射性標識レベルは、たぶん放射性標識化合物の腎臓からのより遅い除去によるものであろう。

第3図Bは第3図Aに映像化した動物のものと同じではあるが、化合物投与24時間後の動物のものを示す。より長期間の映像化における主要な相違は、膀胱中の標識が無いことである。低いバックグラウンドの良好な腫瘍の映像化が達成される。

前述のことから、本発明のいかに種々の目的と特徴とが達成されるかが理解され得る。この方法は選択された標的部位への標的特定の抗体の蓄積を基礎にした、治療的もしくは放射性映像化の化合物の選択的局在性を提供する。この特徴は、治療物質による副作用の減少という改善された治療的効果、そしてバックグラウンドレベル、特に循環する放射性核種によるバックグラウンドレベルの減少という改善された映像化を可能とする。

レベルを得るために、従来は循環タンパクに金属を結合させることが必要であった。この方法は数日間にわたっての血液中の高レベルの放射性核種のために、安全に投与できるタンパクに結合した金属の量により制限される。本発明では、非局在化放射性核種の大部分は数時間で除去される。この有利な点は、標的部位で効果的な薬剤レベルを達成するためには大量に投与しなければならない抗腫瘍薬剤のような治療薬にも適用される。従来は、大量な投与量に伴う重大な副作用のために、多くの抗腫瘍薬剤においては薬剤投与が制限されている。本発明では、標的部位における高濃度の結合タンパクの存在のために、その部位への薬剤の特異的結合により、より少ない注射薬剤量で腫瘍部位の治療に効果的な薬剤濃度を得ることが可能となる。

次に述べる実施例は、本発明の調製および使用法の特別な実施態様を説明しているが、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1

前記化合物の局在化は該化合物注射後短期間、たとえば1~4時間で起こるので、約1~6時間の半減期をもつ放射性核種が放射性映像化に用いられ得る。特に、この方法では、半減期6時間の ^{99m}Tc および半減期68分の ^{67}Ga の両方を腫瘍や他の内臓標的部位の放射性映像化のために比較的低い放射性活性量で用いることができる。放射性映像化剤としての ^{67}Ga の特に有利な点は、局在化放射性標識の絶対量定量と5mmまでの解像度が可能な映像化技術であるポジトロン エミッション トモグラフィ (PET) における使用である。従来はPETに必要な放射性核種のほとんどは、掘付けのサイクロトロンが必要であった。本発明により、1時間以内に大量の放射性核種を局在化させる能力は、より安価な ^{67}Ga 発生器により生成することができる放射性核種の量と適合する。

非局在化化合物の腎臓による迅速な除去は、全身中での化合物に付随する毒性を実質的に除くことができることを意味する。例えば ^{111}In 放射性映像化の場合、局在化部位での放射性核種の高い

TBEDTAの調製

1,4-ブタンジチオールはAldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)から得；p-ブプロモアセトアミドベンジルEDTA (BABE-EDTA)は、DeRiemer (1981)に記されている方法で調製した。キャリアのない $^{111}\text{InCl}_3$ は、Medi-Physicsから得、DeRiemer (1981)の方法で精製した。

10倍モル過剰の1,4-ブタンジチオールを全水溶液量を15ml中でBABE-EDTAに結合させた。そしてその溶液を水酸化ナトリウムでpH 8.2に調整した。反応は室温で進行させ、薄層クロマトグラフィでモニターした。メタノール：酢酸アンモニウム水溶液 (1:1) 溶媒系でシリカゲル板で展開したときのRf値は約0.7だった。

反応液をエーテルで抽出し、過剰のジチオブタンを除去し、ジチオブタン-BABE-EDTA (TBEDTA) 生成物を乾燥させた。乾燥物を0.1M酢酸緩衝液に再溶解させた。

TBEDTAのCoまたはIn金属キレートを形成させるために、該金属イオンの入った0.01M塩酸約50μl

を、等モル容量の0.5mM TBEDTAに加えた。ボルテックス混合後、この溶液を NaHCO_3 で中和した。TBEDTA

-In および TBEDTA-Co化合物は、それぞれTLCで単一のRf値を示した。

実施例2

Anti-TBEDTA-Co Mabs の調製

キーホール リムベット ヘモシアニン(Keyhole limpet hemocyanin ; KLH)は、Calbiochem Co (LaJolla, CA) から得た。

タンパクをリン酸緩衝液に溶かし、トラウト試薬、2-イミノチオレートと、モル比1 : 100 (タンパク : 試薬) で標準条件下で反応させた。トラウト試薬は、タンパク質のリジンのアミノ基と反応し、4-カーボンアミジンを形成し、スルヒドリル基をなくす。分子ふるいクロマトグラフィーで過剰のトラウト試薬を除去した後、タンパクを10倍モルの過剰のBABE-EDTA-Coと、実施例のような条件で反応させた。得られたタンパク生成物は次式で示される：



ここで、 $\text{KLH} \cdots \text{NH}_2$ は、KLH のリジニルアミンである。

誘導されたタンパクを分子ふるいクロマトグラフィーで未反応のTBEDTA-Coと分離し、約24mg/mlまで濃縮し、マウスに注射するためにフロイント アジュバント (Freund's adjuvant) と混合し、約5~10 μg /動物になるようにした。マウスのミエローマ細胞、ラインP3X63-Ag8.653は、American Type Culture Collection, Rock Lawn, MD, から得、ATCCのCRL 1580と同定される。マウスのIgG イムノグロブリンに対する酵素ラベルしたヤギの抗マウス抗体は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から得、IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} およびIgG₃イムノグロブリンに対して特異的なサブクラス特異性ヤギ抗マウス抗体は、TAGO, Inc. (Burlingame, CA) から得た。

雌のBalb/Cマウスを、ハプテン/アジュバントで免疫し、免疫4週間後にこのマウスからの脾臓細胞を採取した。これをマウスのミエローマ細胞と細胞比で1 : 2の割合で混合した。この細胞を、

血清なしのRPMIで洗浄し、ペレットを形成させた。このペレットを、あらかじめ37℃に加温したRPMI 1 mlと45% (V/V) のポリエチレングリコール (分子量1430~1570 ; BDB Chemicals, Poole, England) との溶液に再懸濁した。2分後に、室温で細胞懸濁液をRPMIで6 mlに希釈し、500gで3分間遠心分離し融合を開始して8分後、細胞のペレットを10% FCSで洗浄した。

融合細胞を20% FCSと100 μM ヒポキサンチンと19 μM チミジンとを含むRPMI (HT培地) に懸濁し、10⁵ 細胞/ウェルになるように、60ウェルトレイ、合計2000ウェルのマイクロタイターウェルにプレートした。培養は6%二酸化炭素中37℃の湿らせた培養器で行った。24時間後、培地をHT培地に800nMのアミノプテリンを加えた選択培地 (HAT培地) に変えた。HAT選択培地はHT培地に変えるまでの14日間使用した。このときに、融合していないマウスのミエローマ細胞および融合していない脾細胞は100%死に致った。

マイクロタイターの各ウェルの細胞上澄液は、

抗-TBEDTA-Co抗体で、固相酵素イムノアッセイで測定した。固相測定試薬は、マルチウェルプレートのマイクロタイターウェルの底に、ヒトトランスフェリンが結合したTBEDTA-Co (実施例3) を吸着させて調製した。アッセイにおいては、各ウェルの培養上澄液50 μl を、ウェルに加え、吸収された抗原に室温で60分間反応させた。ウェルを数回緩衝液で洗浄後、50 μl の酵素ラベルしたヤギの抗マウスIgG抗体を加え、再び室温で60分インキュベートした。さらに洗浄後、標準法により定性的呈色反応によってウェルに結合した酵素を測定した。

8つのウェルの抗-TBEDTA抗体を同定し、これらの親ラインのうち3つを、クローナル抗体プロデューサーを選択するためにマイクロタイターウェル中で、リミティングダイリューションにより、クローニングした。細胞上澄液は、上記のように抗-TBEDTA抗体でアッセイした。3つの親ラインそれぞれからのクローナル抗体を生産する子孫を選択した。3つのセルラインを、WC3A11, WC4B7

および WC3P5と同定した。3つのセルラインはすべて、数ヵ月間安定な抗体生産がみられた。

IgG サブクラスと、TBEDTA-Co, TBEDTA-In (それぞれ第1図の化合物BのCoおよびInのキレートである) および, BLEDTA-IV-In (第1図の化合物AのInキレートである) の抗体結合親和性とを表1に示す。3つの抗体の抗体サブクラスは、それぞれサブクラス特異的な、特異的ヤギの抗マウスイムノグロブリンを用いた標準的なイムノディフュージョン沈澱法によって決定した。3つのモノクローナル抗体の結合定数は、標準的なELISA法(Friguet)によって決定した。結合定数は、 M^{-1} 単位で表現されている。結合定数値の下のかっこ内に示された数値は、対応するCoまたはIn放射性核種を含む、抗体/キレート複合体を投与24時間後の放射性核種金属の全身での保持率を示している。

(以下余白)

表1

クローン	Igサブクラス	Co-1,4 DT BABB	In-1,4 DT BABB	In-BLEDTA IV
WC 3A ₁₁	IgG ₂	1.6×10^9 (70%)	4.5×10^9 (31%)	$6 \times 10^9 M^{-1}$ (66%)
WC 4B ₇	IgG _{2a}	1.8×10^9	2.4×10^9	$2.8 \times 10^9 M^{-1}$ (61%)
WC 3P ₅	IgG _{2a}	3.0×10^9	2.9×10^9	$1.7 \times 10^9 M^{-1}$ (65%)

%は 600 μ g WC3A11を用いた24時間後の全身の保持率を示す。

結合データは、3種の抗体すべてが Co-TBEDTA に高い親和性をもつことを示す。これらのハプテンがマウスの抗体を刺激するために使われた。対応する In-TBEDTA化合物に対する結合定数はさらに小さく、いくらか抗体に包含される金属に特異性があることを示した。しかしながら、抗体はすべて In-BLEDTA-IV 化合物に強く反応した。これは、TBEDTAの中にチオブタン/BABE/EDTA構造を含んでおり、特異性は、主として Co-TBEDTAハプテンの非金属部分によることを示唆した。結合定数のデータは、すべての抗体の保持率のデータと一致し、これは、(研究されたWC3A11抗体に対し)実質的に、Co-TBEDTAおよび In-BLEDTA-IV化合物は、より強固に結合していない In-TBEDTA化合物よりも保持率が大きいことを示す。

実施例 3

TBEDTA誘導 ヒト トランスフェリンの調製

ヒト トランスフェリンをリン酸緩衝液に懸濁し、まず最初に、約10倍過剰の実施例2のトラウト試薬と反応させた。未反応のトラウト試薬を除

調製した。WC3A11抗体複合体は、実施例2で得られるWC3A11抗体と、選択した ^{111}In cpm量の、(a) ^{111}In -EDTA, (b) ^{111}In -BABE-EDTA, (c) BLEDTA-II- ^{111}In , (d) BL- ^{57}Co , (e) BLEDTA-IV- ^{111}In , または(f) TBEDTA- ^{111}In とインキュベートして形成させた。

各抗体/EDTA- ^{111}In または ^{57}Co 複合体(a)~(f)は約200~800 μg /動物になるような量を、各3匹のBalb/Cマウスの静脈に注射した。注射して24時間後の動物体全体の ^{111}In の放射活性を、デュアルプロープシンチレーションカウンターで測定した。その測定値を3匹の動物で平均した。化合物(a)~(d)の抗体複合体(これらはチオブタン-BABE-EDTA部分を含まない)では、24時間後の保持率はすべて約5%未満であった。対照的に、化合物(e)および(f)の抗体複合体(両者ともチオブタン-BABE-EDTA部分を含む)は、24時間後に、最初の抗体量が約180 μg のとき30%を超える割合で、そして約800 μg のとき約70%を超える割合で保持されていた。

去した後、誘導されたタンパクを、種々の倍量過剰のBABE-EDTA-Coと、実施例2のように反応させて、誘導タンパクを形成させた。このタンパクは、1モルのタンパクに対して約4モルのBABE-EDTA-Coが結合している。過剰のキレートは、分子ふるいクロマトグラフィーで除去され、タンパクが濃縮された。

実施例 4

動物腫瘍に対するTBEDTA- ^{111}In の標的化

実施例1で行ったようにして、EDTAおよびBABE-EDTAを、 ^{111}In およびブレオマイシン、そして ^{57}Co で複合体化した。BLEDTA-II- ^{111}In 、ブレオマイシン-EDTA-In化合物は、ブレオマイシンとEDTA部分との間にジチオブタン結合を含んでいないもので、DeRiemer, 1979に従って調製された。BLEDTA-IV- ^{111}In 、ブレオマイシン-EDTA-In化合物は、ジチオブタン Spacer を介してブレオマイシンと結合したEDTAを含んでおり、共同特許出願している「ブレオマイシン結合物および方法」を適用して調製した。TBEDTA- ^{111}In は、実施例1のように

実施例 5

^{111}In による腫瘍標的化

本実施例では、本発明方法による動物腫瘍の ^{111}In による標的化を調べた。Balb/Cマウスの脳腫に、KHJJ腺状組織悪性腫瘍の組織片を移植した。CHA255であると同定された、L-ベンジル-EDTA-Inに対して特異的なハイブリドーマセルラインは、実施例2に述べた方法で、KLHから誘導された免疫源、L-ベンジル-EDTA-In(パラニトロフェノールベンジル-EDTA-In)グループを使って調製された。

最初の実験では、3匹のマウスは、100 μg (約0.7nモル)のCHA255抗体がL-ベンジル-EDTA- ^{111}In 化合物と結合したものを注射した。24時間後、動物を殺し、血液、腫瘍、および表2Aにあげたいくつかの組織の ^{111}In レベルを調べた。放射活性レベルは、組織1gあたりの総放射活性パーセントから算出した。3匹のマウスの平均値と、標準偏差値とが表2Aの中央の欄に示されている。腫瘍/組織(T/O)比は表の右欄に示されている。表からわかるように、腫瘍部分にも高割合の放射活

性が残存しているが、血液中に多くの放射活性が残存していることがわかる。

表 2 A

ハプテン-抗体複合体

24時間、濃度

	% / gm	S.D.	I/O 比
血液	13.41 ± 1.48		0.8
心臓	3.23 ± 0.48		3.5
肺	6.50 ± 0.91		1.7
肝臓	5.76 ± 0.86		2.0
脾臓	2.50 ± 0.37		4.5
腎臓	3.73 ± 0.81		3.1
腫瘍	11.28 ± 1.40		
筋肉	1.18 ± 0.16		9.6
骨	1.42 ± 0.22		8.0
皮膚	2.35 ± 1.19		5.7
消化管	2.07 ± 1.42		7.4

第2の実験では、まず抗体だけを3匹の動物にそれぞれ投与し、23時間局在化させた後、L-ベンジル-EDTA-¹¹¹In 化合物を投与した。1時間後、動物を殺して再び放射活性レベルを調べた。表2 Bから、通常、抗体と¹¹¹In化合物とを同時に投与したときと比べて、低いレベルの腫瘍の取り込みおよび低いレベルの腫瘍/組織取り込み比、そして、¹¹¹In化合物の高い血中レベルが観察されることがわ

腫瘍中の濃度に比べて、血液中や、内部組織中の¹¹¹Inレベルは、大幅に減少していた。

表 2 C

ハプテンを加える25時間前に抗体投与：

ハプテンを加えて3時間後の濃度

	% / gm	S.D.	I/O 比
血液	0.92 ± 0.44		9.20
心臓	0.92 ± 0.29		0.71
肺	2.55 ± 0.24		3.02
肝臓	0.87 ± 0.39		10.21
脾臓	0.21 ± 0.04		38.03
腎臓	1.10 ± 0.16		7.04
腫瘍	7.72 ± 1.35		
筋肉	3.48 ± 0.77		2.33
骨	1.50 ± 0.37		5.40
皮膚	4.86 ± 0.45		1.61
消化管	2.66 ± 0.61		2.97

実施例 6

腫瘍の像

3匹のA Balb/Cマウスの腹腔にKHJJ腺状組織癌性腫瘍を移植した。このマウスに約 100 μ g のWC3A11抗体（実施例2）を投与した。抗体を投与して20時間後、動物に実施例3にあるトランスフェリン/BABE-EDTA-Co除去剤を与えてチェイスした。1時間後（抗体投与から21時間後）、動物にBLEDTA

かる。

表 2 B

ハプテンを加える23時間前に抗体投与：

ハプテンを加えた1時間後の濃度

	% / gm	S.D.	I/O 比
血液	24.01 ± 0.80		0.17
心臓	5.40 ± 0.49		0.76
肺	9.72 ± 0.24		0.42
肝臓	6.35 ± 0.50		0.64
脾臓	3.03 ± 0.27		1.36
腎臓	5.87 ± 0.81		0.70
腫瘍	4.08 ± 0.51		
筋肉	1.44 ± 0.16		2.84
骨	1.57 ± 0.09		2.59
皮膚	1.60 ± 0.20		2.57
消化管	1.51 ± 0.19		2.73

第3の実験では、本発明による抗体、抗体クリアランスおよび化合物の投与を実行することによって達成される腫瘍の局在化の割合を調べた。CBA255抗体を、3匹の動物にそれぞれ投与し、24時間局在化させた後、L-ベンジル-EDTA-In誘導のトランスフェリンから成る除去剤を投与することで抗体を血液中から除去した。1時間後に、L-ベンジル-EDTA-¹¹¹In 化合物を投与し、その3時間後に、動物を殺した。表2 Cのデータからわかるように、

¹¹¹Inを注射した。3時間後、コンピューター デジタイゼーションを使って、動物の全身映像を走査した。得られた動物の1匹の代表的な映像を第3図Aに示す。映像は放射活性が、腎臓(A)、膀胱(B)、および腫瘍領域(T)に集中していることを示している。3時間後に投与した¹¹¹Inの約16%が残っていた。動物の2匹をこの時点で殺し、血中、腫瘍、表3に示すそして他の組織中の、¹¹¹Inレベルを測定した。この表からわかるように、この方法は、良好な腫瘍による取り込みを示し、腫瘍対血液比が高く、腫瘍対腎臓比が低い。これは、(a)腫瘍中の放射活性の局在化および(b)腎臓による迅速な血液中の放射活性の除去、と一致する。

(以下余白)

表 3

組織	線量% / g 組織	腫瘍 / 組織
血液	0.71	5.55
心臓	0.40	9.85
肺	1.01	3.91
肝臓	1.24	3.20
脾臓	0.39	10.11
腎臓	37.78	0.11
腸胃	3.95	1.00
筋肉	0.21	18.52
骨	1.06	3.73
皮膚	0.05	4.64
消化管	1.17	3.39

同様の全体映像の走査を24時間後に行った（抗体投与から48時間後）。得られた映像を第3図Bに示す。これは、最初のスキャンと同じようであるが、膀胱中の相対値が比較的減少している。最初に注射した¹¹¹Ia物質の約14%が存在していた。

本発明は、特殊な実施態様および特徴について述べられているが、種々の変形および修飾、特にエビトープ性化合物およびそれに関連した結合タンパクに関する変形および修飾が本発明の主旨から離れることなくなされることが理解される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、(A) プレオマイシン-EDTA 金属キレ

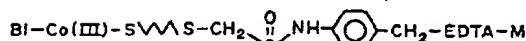
ートおよび(B) ジチオブタン-EDTA-金属キレート分子構造を示す。これらは、本発明の方法により充実性腫瘍に標的化し得るエビトープ化合物の代表的な実施態様である。

第2図は、本発明の方法により治療用あるいは放射性診断用の化合物が組織内で局在化する段階を、図式により示す。

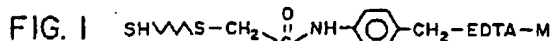
第3図は、腫瘍を保持している動物における、本発明の方法により放射性核種-キレート化合物の投与後3時間(A) および24時間(B)の全身の光起走査を示す。

以上

代理人 弁理士 山本秀策



(A)



(B)

FIG. 1

代理人 弁理士 山本秀策

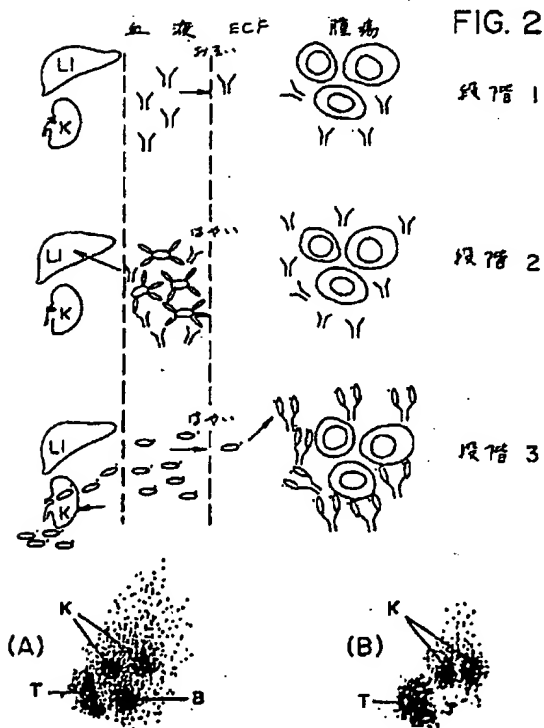


FIG. 3

第1頁の続き

⑫発明者	クロード ミアーズ	アメリカ合衆国 カリフォルニア	95616	デービス, ト ローラー プレイス 3310
⑬発明者	ミカエル マツコール	アメリカ合衆国 カリフォルニア	95688	ヴェイカヴィ ル, リッジウッド ドライブ 513

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成6年(1994)6月21日

【公開番号】特開昭63-5033

【公開日】昭和63年(1988)1月11日

【年通号数】公開特許公報63-51

【出願番号】特願昭61-236984

【国際特許分類第5版】

A61K 49/02 9164-4C

43/00 8415-4C

手続補正書

平成5年9月9日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第236984号

2. 発明の名称

化合物標的化システムまたは組成物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94305

スタンフォード(番地なし)

名称 ザ ボード オブ トラストィズ オブ

ザ リーランド スタンフォード

ジュニア ユニバーシティ

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見

一丁目2番27号 クリスタルタワー18階

氏名 (7828) 井理士 山本秀策

電話(大阪) 06-947-9910

5. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄、特許請求の範囲の欄
および発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

6.1 明細書の発明の名称の「化合物標的化方法
およびそのシステム」とあるのを「化合物標的化
システムまたは組成物」と補正する。

6.2 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり補
正する。

6.3-1 明細書の第7頁下から9行目に「薬品」
とあるのを「薬剤」と補正する。

6.3-2 明細書の第7頁下から7行目、第15頁
下から9行目、第15頁下から8行目、第15頁
下から3行目、第16頁1行目、第17頁6行目、
第20頁1行目に「システム」とあるのを「シス

方式
審査



テムまたは組成物」と補正する。

6.3-3 明細書の第17頁4行目に「化合物標的化システム」とあるのを「化合物標的化システムまたは組成物」と補正する。

6.3-4 明細書の第29頁5行目、第38頁7行目に「系」とあるのを「システムまたは組成物」と補正する。

6.3-5 明細書の第9頁8行目、第9頁下から8～7行目、第10頁6行目、第10頁最下行、第11頁下から5行目、第12頁11行目、第15頁下から8行目、第20頁下から4行目、第38頁1行目、第66頁3行目に「充実性腫瘍」とあるのを「固形腫瘍」と補正する。

6.3-6 明細書の第9頁下から3行目、第10頁8行目、第21頁2行目、第22頁1行目、第22頁4行目、第46頁下から4行目、第47頁下から6行目、第48頁3行目、第48頁6行目、第48頁下から2～1行目に「放射性映像化」とあるのを「放射性画像化」と補正する。

6.3-7 明細書の第19頁下から6～5行目に「

のを「画像」と補正する。

6.3-15 明細書の第18頁1行目、第18頁9行目、第18頁下から6行目、第19頁1行目、第20頁6行目、第23頁3行目、第34頁下から7行目に「経口」とあるのを「非経口」と補正する。

6.3-16 明細書の第10頁最下行～第11頁1行目に「放射性感受」とあるのを「放射性感作」と補正する。

6.3-17 明細書の第11頁最下行に「スルニウム基」とあるのを「スルホニウム基」と補正する。

6.3-18 明細書の第13頁6～7行目、第18頁下から8行目、第20頁9行目に「細網内系」とあるのを「細網内皮系」と補正する。

6.3-19 明細書の第16頁下から6行目、第16頁下から6～5行目、第17頁下から8～7行目、第18頁下から8行目、第20頁8～9行目に「巨大分子会合体」とあるのを「高分子凝集体」と補正する。

6.3-20 明細書の第18頁下から5行目、第1

放射性映像」とあるのを「放射性画像」と補正する。

6.3-8 明細書の第20頁下から2行目に「放射性映像用」とあるのを「放射性画像用」と補正する。

6.3-9 明細書の第47頁7行目、第47頁9行目、第47頁11行目、第47頁最下行に「映像化」とあるのを「画像化」と補正する。

6.3-10 明細書の第48頁7～8行目に「放射性映像化剤」とあるのを「放射性画像化剤」と補正する。

6.3-11 明細書の第44頁下から7～6行目に「映像用タンパク」とあるのを「画像用タンパク」と補正する。

6.3-12 明細書の第64頁2行目に「全身映像」とあるのを「全身画像」と補正する。

6.3-13 明細書の第65頁下から12行目に「全体映像」とあるのを「全身画像」と補正する。

6.3-14 明細書の第64頁3行目、第64頁4行目、第65頁下から11行目に「映像」とある

8頁下から5～4行目に「担体巨大分子」とあるのを「担体高分子」と補正する。

6.3-21 明細書の第18頁下から2行目、第43頁7行目、第43頁8行目に「会合体」とあるのを「凝集体」と補正する。

6.3-22 明細書の第38頁7～8行目に「結合タンパク会合体」とあるのを「結合タンパク凝集体」と補正する。

6.3-23 明細書の第38頁下から7行目、第38頁下から2行目に「会合」とあるのを「凝集」と補正する。

6.3-24 明細書の第36頁最下行に「正味のタンパク」とあるのを「完全なタンパク」と補正する。

6.3-25 明細書の第36頁最下行～第37頁1行目に「第1に」とあるのを「最初に」と補正する。

6.3-26 明細書の第17頁5行目、第17頁6行目、第20頁2行目、第20頁下から2行目（2箇所）、第21頁1行目、第21頁9行目、第

21頁下から7行目、第27頁1行目、第27頁3行目、第28頁7行目、第28頁下から6行目、第28頁下から3行目、第29頁6行目、第29頁8行目、第38頁下から10行目、第38頁下から8行目、第39頁下から7行目に「試薬」とあるのを「薬剤」と補正する。

8.3-27 明細書の第37頁最下行、第38頁1行目に「毛管」とあるのを「毛细管」と補正する。

8.3-28 明細書の第40頁下から3行目に「永続性」とあるのを「持続性」と補正する。

8.3-29 明細書の第45頁下から3～2行目に「除去試薬」とあるのを「除去剤」と補正する。

8.3-30 明細書の第54頁下から7行目、第54頁下から3行目に「親ライン」とあるのを「親細胞系」と補正する。

8.3-31 明細書の第54頁最下行、第55頁1行目、第60頁7行目に「セルライン」とあるのを「細胞系」と補正する。

8.3-32 明細書の第63頁下から2行目に「を与えてチェイスした」とあるのを「を与えて追跡した」と補正する。

(以下余白)

特許請求の範囲

1. 薬剤成分が被験体に連続的に非経口投与されると、被験体の内部の標的部に診断用薬剤または治療用薬剤を局在化させる薬剤成分を有するシステムまたは組成物であって、該薬剤成分が、

被験体に非経口投与された際、標的部に選択的に局在化し得るアビジン含有結合タンパク、

ビオチン化タンパクを含有する除去剤であって、該ビオチン化タンパクが、分子量が少なくとも50,000ダルトンであり、タンパク：ビオチン比が少なくとも1：4であり、該被験体の血液中を循環している該結合タンパクと反応して、該被験体の特定の細胞内皮系により除去される高分子凝集体を形成し得る除去剤；および、

ビオチンで誘導された薬剤を含有するビオチン化合物、

を含有するシステムまたは組成物。

2. 前記結合タンパクがアビジンまたはストレプトアビジンである、特許請求の範囲第1項に

記載のシステムまたは組成物。

3. 前記結合タンパクがアビジンあるいはストレプトアビジンに結合した抗体である、特許請求の範囲第1項に記載のシステムまたは組成物。

4. 前記標的部に放射性核種を運ぶために用いられ、前記ビオチン化合物が、安定な金属キレート錯体を形成するために金属放射性核種イオンと錯体化したビオチン化キレート化合物である、特許請求の範囲第1項ないし第3項のうちいずれか1つに記載のシステムまたは組成物。

5. 前記キレート化合物が、1-フェニルまたは1-ベンジルEDTAの金属キレートである特許請求の範囲第4項に記載のシステムまたは組成物。

6. 前記キレート化合物が、前記ベンジル部分にチオブタン Spacer アームにより結合した金属キレートである特許請求の範囲第5項に記載のシステムまたは組成物。

7. 固形腫瘍の治療に用いられ、前記金属キレートが⁹⁰Y、¹⁰⁷Br または⁶⁷Cuのキレートであり、もしくは体内の腫瘍を放射線感作するのに用いら

れ、該金属キレートが鉄、銅またはルテニウムで
ある、特許請求の範囲第4項ないし第6項のうち
いずれか1つに記載のシステムまたは組成物。

8. 体内の腫瘍の放射性画像化に用いられ、
前記金属キレートが ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{64}Cu 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、
 ^{68}Ga 、 ^{82}Zn 、 ^{67}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{87}Re 、 ^{57}Co または
 ^{53}Co のキレートである、特許請求の範囲第4項な
いし第6項のうちいずれか1つに記載のシステム
または組成物。

9. 前記結合タンパクが、腫瘍に血液を供給
する毛細管壁を通して選択的に透過性のある、特
許請求の範囲第1項ないし第8項のうちいずれか
1つに記載のシステムまたは組成物。

(以上)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.